

## 人工合成的 CpG 单链脱氧寡核苷酸及其抗病毒作用

### 技术领域

本发明涉及系列的人工合成的具有抗病毒作用的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是涉及对单股正链 RNA 病毒，如 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒等引起的传染性疾病及对流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病有治疗和预防作用的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，以及用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由病毒，特别是单股正链 RNA 病毒，如 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒等引起的传染性疾病及流感病毒引起的人流感等呼吸道感染方法。

### 背景技术

近年来的研究表明，多种具有 CpG 结构的细菌和病毒 DNA 对人的免疫系统是危险信号，可激活多种免疫细胞启动机体对细菌和病毒的抵抗机制。CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸，C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，p 代表磷酸。进一步的研究表明，人工合成的含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA (CpG ODN) 也可表现强效的免疫增强和免疫调节作用，也可激活多种免疫细胞启动机体的抗病毒机制，表现出明显的临床应用前景。

在小鼠和豚鼠阴道应用 CpG ODN 可提高小鼠抵御致死量 HSV-2 病毒攻击的能力 (Pyles, R. B. et al. 2002. Journal of Virology, 76(22):11387-11396)。给小鼠应用 CpG ODN 可减少其呼吸道合胞病毒 (RSV) 的荷量 (Cho, J.Y., et al. 2001. J. Allergy. Clin. Immunol., 108(5):697-702)。给感染弗兰德病毒 (一种鼠类白血病病毒) 的小鼠应用 CpG ODN 可明显减低小鼠血中的病毒载量 (Olbrich, A. R. M. et al. 2002. Journal of Virology, 76(22):11397-11404)。给正常 C57BL/6 小鼠于病毒攻击前 2 天静脉注射 CpG ODN，然后用正常致死量的单纯疱疹病毒 2 型

(HSV-2) 静脉攻击, 结果发现 CpG ODN 可使小鼠阴道分泌物中病毒滴度明显降低并刺激生殖道粘膜快速产生 IFN- $\gamma$ 、IL-12 和 IL-18 等保护性细胞因子 (Harandi, A. M., et al. 2003. *Journal of Virology*, 77(2):953)。

流感病毒是引起人流感的病原体。在 1918-1919 年, 全世界有两千万人死于流感病毒的流行(Patterson, K.D. & Pyle, G. F. 1991. *Bull. Hist. Med.*, 65:4-213)。流感病毒如此猛烈和难于控制与其本身下述特点密切相关:

(1)在空气传播;

(2)不断变化抗原性逃逸(antigenic drift)已形成的保护性免疫(Parvin, J. D. & Moscona, A. 1986. *J. Virol.*, 59:377-383; Webster, R. G. 1982. *Nature*, 296:115-121)

(3)通过不同株流感病毒 RNA 可在同一感染细胞内交互重组周期性产生新的突变体 (Webster, R. G. 1992. *Microbiol. Rev.*, 56:152-179)。

接种疫苗和应用抗病毒药物是防治流感病毒的两类主要方法(Bridges, C. B. et al. 2001. *Morbid. Mortal., Wkly. Rep.*, 50:1-44), 但事实证明, 这两类方法均不能有效地控制流感的流行(Webster, R. J. & Webster, R. G. 2001. *Philos. Trans. R. Soc., London*, 356:1817-1828)。在易感人群, 接种疫苗的短期(半年)保护率约为 39% (Fukuda, K. & Cox, N. J. 1999. *Morbid. Mortal., Wkly. Rep.*, 48:1-28; Castle, S. C. 2000. *Clin. Infect. Dis.*, 31:578-585)。由于流感病毒抗原[血细胞凝集素 (HA)和神经酰胺酶(NA)]性不断变化, 现行的疫苗几乎每年都要重新改构。由于副作用较大和新的抗药流感病毒株不断出现, 一些获准抗流感病毒药物的效果也不理想(Luscher-Mattli, M. 2000. *Arch. Virol.*, 145:2233-2248)。

传染性非典型肺炎是由 SARS 病毒引起的人呼吸道的传染性疾病, 可引起呼吸窘迫综合症 (severe acute respiratory syndrome, SARS), 感染者的死亡率为 4-12%。传染性非典型肺炎的病原体是一种变异了的冠状病毒---SARS 病毒, 属有包膜的单股正链 RNA 病毒 (Drosten, C. 2003. *The New England Journal Of Medicine*, 348:19; Rota, P. A., et al. 2003. *Science*, 300 (Issue 5624):1394-1399)。丙型肝炎的病原体丙型肝炎病毒也是一种有包膜的单股正链 RNA 病毒 (Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. 2001. In

Fields virology, D. M. Knipe & P. M. Howley (ed.), 1:991-1041, Lippincott/The Williams and Wilkins Co., Philadelphia, Pa)。丙型肝炎病毒属黄病毒科病毒。黄病毒科的另外两种病毒，登革热病毒 (Wang, W.-K., et al. 2002. Journal of Virology, 76(9):4662-4665) 和日本脑炎病毒 (Yun, S.-I. 2003. Journal of Virology, 77(11):6450-6465) 也都是有包膜的单股正链 RNA 病毒。目前对由 SARS 病毒引起的人呼吸道的传染性疾病和呼吸窘迫综合症尚无有效的疗法。一些抗病毒药物对由丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒等引起的传染性疾病的疗效也不理想。

#### 发明内容

本发明的目的之一是提供人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，特别是可刺激人外周血细胞产生抗病毒的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，所述的病毒包括单股正链 RNA 病毒和流感病毒。人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，其磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。优选地，本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有 SEQ ID NO: 1-5 所示的序列。

本发明的目的之二是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗病毒，特别是单股正链 RNA 病毒，如 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎等及流感病毒的作用。

本发明的目的之三是提供本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸对病毒，特别是单股正链 RNA 病毒，如 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的传染性疾病及对流感病毒引起的人流感等呼吸道感染性疾病的治疗和预防的作用。

本发明的目的之四是提供用人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸治疗和预防由病毒，特别是单股正链 RNA 病毒，如 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒等引起的传染性疾病及流感病毒引起的人流感等呼吸道感染方法。

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。特别地，下列术语具有如下的含义：

优选地，本发明的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸具有如下所示的序列：

SEQ ID NO: 1

DVAX-1 : 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg -3'

SEQ ID NO: 2

DVAX-3 : 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTggggg -3'

SEQ ID NO: 3

DVAX-4 : 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3'

SEQ ID NO: 4

DVAX-5 : 5'-TCggggACgATCgTCggggggg-3'

SEQ ID NO: 5

DVAX-6 : 5'-ggATCgATCgATCgATggggggg-3'

其中的磷酸二酯键可以是部分硫化的，全部硫化的，也可以是未硫化的。

本发明的 CpG 单链脱氧寡核苷酸可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。以下的实施例详细地例举了一种生产本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的方法。

在预防和治疗由单股正链 RNA 病毒特别是 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒引起的人传染性疾疾病时，人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的一次用药剂量为 1-5000 微克。

本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的使用方式包括单独应用或与其它抗病毒药物或疫苗联合使用，与治疗 and 预防由病毒引起的感染性疾病的药物或疫苗通过交联剂共价偶联使用，其中所述的病毒优选为单股正链 RNA 病毒，如 SARS 病毒、丙型肝炎病毒、登革热病毒和日本脑炎病毒或流感病毒。

应用方式包括粘膜（包括呼吸道、消化道和泌尿生殖道黏膜）表面应用，滴眼，皮下、肌肉注射应用，胃肠应用，腹腔应用，静脉注射等常用的方式应用。

另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通

技术人员来说是可以直接推知的。

#### 附图说明

图 1、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸刺激人外周血单个核细胞培养上清对流感病毒攻击 Vero 细胞的保护作用

#### 具体实施方式

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例，进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

在如下实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法，例如合成采用固相亚磷酰胺三酯法。在如下实施例中，所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者，均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明，不在赘述上述内容。

#### 实施例 1 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的制备

采用固相亚磷酰胺三酯法合成人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸：

##### 1) 脱保护基

用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连结在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基(DMT)，获得游离的 5'-羟基端，以供下一步缩合反应。

##### 2) 活化

将亚磷酰胺保护的核苷酸单体与四氮唑活化剂混合并进入合成柱，形成亚磷酰胺四唑活性中间体(其 3'-端已被活化，但 5'-端仍受 DMT 保护)，此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

##### 3) 连接

亚磷酰胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时，将与其 5'-羟基发生亲合反应，缩合并脱去四唑，此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

##### 4) 封闭

缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在

随后的循环反应中被延伸，常通过乙酰化来封闭此端羟基，一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

### 5) 氧化

缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酸酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接，而亚磷酸酯键不稳定，易被酸、碱水解，此时常用碘的四氢呋喃溶液将亚磷酸酯转化为磷酸三酯，得到稳定的寡核苷酸。

经过以上五个步骤后，一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上，同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后，重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基(一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护；G 碱基用异丁酰基保护；T 碱基不必保护；亚磷酸用膦乙基保护)、纯化(常用的有 HAP, PAGE, HPLC, C18, OPC 等方法)、定量等合成后处理即可得到本发明的符合实验要求的寡核苷酸片段，如下所示(见 SEQ ID NO: 1-5 所示)：

DVAX-1 (SEQ ID NO: 1): 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAggggggg-3'

DVAX-3 (SEQ ID NO: 2): 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTggggg-3'

DVAX-4 (SEQ ID NO: 3): 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3'

DVAX-5 (SEQ ID NO: 4): 5'-TCgggggACgATCgTCggggggg-3'

DVAX-6 (SEQ ID NO: 5): 5'-ggATCgATCgATCgATggggggg-3'.

未硫化的 CpG 单链脱氧寡核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成；全硫化及部分硫化 CpG 单链脱氧寡核苷酸的合成采用置换法，在 ABI 394 DNA 合成仪上合成。

实施例 2 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗流感病毒作用

#### 1、人外周血单个核细胞的分离

将肝素抗凝的人外周血(来自长春市中心血站两个正常献血员)沿管壁缓慢加于比重为  $1.077 \pm 0.001$  的聚蔗糖-泛影葡胺(购自北京鼎国生物技术有限公司)淋巴细胞分层液面上，分离液与肝素抗凝外周血的比例约为 2:1。

水平离心机离心， $1,000 \times g$  15—20min，离心后管内液体分为 3 层，

用吸管吸取白色云雾层液体带，置入另一管中。加入等倍体积的 Hank's 液（无血清，Hank's 液（无钙离子、镁离子）的配制：氯化钠 8.0 克，氯化钾 0.4 克，磷酸氢二钠（带一个结晶水）0.06 克，磷酸二氢钾 0.06 克，碳酸氢钠 0.35 克，葡萄糖 1.0 克，酚红 0.02 克，加入双蒸水至 1000 毫升。将上列成分混合后溶化，8 磅 15min 灭菌，4℃冰箱保存。临用时用 7.4% NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.3~7.6。），混匀，800—1,000 xg，离心 15min，弃上清。用 Hank's 液离心洗细胞两次。

末次离心后，弃上清，加入 2ml 10%FCS RPMI1640 完全培养液（RPMI1640 培养液的配制：含 L-谷氨酰胺的 RPMI1640(GIBCOBRL) 10.4 克，碳酸氢钠 2.0 克，庆大霉素 10 万单位，加三蒸水至体积 1000 毫升，0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。），重悬细胞。

取一滴细胞悬液稀释后做细胞计数。数四个大方格内的细胞总数，单个核细胞浓度(细胞数 / 1 毫升细胞悬液)=4 个大方格内细胞总数 / 4×10<sup>4</sup>×2(稀释倍数)。

## 2、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗流感病毒作用的测定

用含 10%胎牛血清的 IMDM 培养液（1000 ml 含庆大霉素 10 万单位。0.22 微米的滤膜抽滤除菌、分装。）调节人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10<sup>6</sup> 个 / 毫升。加此细胞悬液于 12 孔培养板，每孔 2 ml。加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸（6.25μg/ml）。

设 DVAX-1 对照：加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸（5'-TgCTTgggTggCAgCTgCCAgggggg-3'）；

培养液对照：不加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸。37℃，5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时，收集上清，检测其抗流感病毒的活性。

用 5%胎牛血清 IMDM 调节生长状态良好的 Vero 细胞（ATCC）浓度至 3×10<sup>5</sup> 个/ml。将细胞接种于 96 孔平底培养板，每孔 100μl。将含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 CpG 刺激上清用 5%胎牛血清 IMDM 稀释 10 倍后，加样，每孔加入 100μl（此时，每孔体积 200μl，即 100μl 细胞悬液 + 100μl 稀释后的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 CpG 刺激人上清或对照上清）。设干扰素对照，流感病毒对照和正常 Vero 细胞对照。37℃，5%CO<sub>2</sub>

液（长春生物制品研究所）200 $\mu$ l，继续培养 48—72 小时。待病毒对照孔细胞 80—100% 发生病变，而细胞对照孔细胞状态良好时，终止培养，用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200  $\mu$ l 0.5% 结晶紫染液，37℃，15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。0.5% 结晶紫染液：结晶紫 0.5 克，NaCl 0.85 克，溶于 50 毫升无水乙醚。加 3 毫升甲醛，47 毫升蒸馏水。照相记录结果。按表 1 所示加样，结晶紫染色后的结果见图 1。

表 1、96 孔板加样表

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	培养液对照		IFN $\alpha$ (10IU/ml)		IFN $\alpha$ (100IU/ml)		IFN $\alpha$ (1000IU/ml)		流感病毒		正常 Vero 细胞	
<b>B</b>	正常 Vero 细胞		IFN $\alpha$ (10IU/ml)		IFN $\alpha$ (100IU/ml)		IFN $\alpha$ (1000IU/ml)		正常 Vero 细胞		正常 Vero 细胞	
<b>C</b>	DVAX-1 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-3 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-4 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-5 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-6 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml	
<b>D</b>	DVAX-1 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-3 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-4 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-5 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-6 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml	
<b>E</b>	DVAX-1 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-3 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-4 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-5 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-6 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml	
<b>F</b>	DVAX-3 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 对照 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 对照 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-4 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-5 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-6 1:20 稀释 6.25 $\mu$ g/ml	
<b>G</b>	DVAX-3 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 对照 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 对照 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-4 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-5 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-6 1:100 稀释 6.25 $\mu$ g/ml	
<b>H</b>	DVAX-3 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 对照 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-1 对照 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-4 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-5 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml		DVAX-6 1:500 稀释 6.25 $\mu$ g/ml	

注释：DVAX-1 对照：人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，其序列为：  
5'-TgCTTgggTggCAgCTgCCAgggggg-3'

培养液对照：未加人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的培养上清  
正常 Vero 细胞：未加流感病毒

流感病毒：未加细胞培养上清，加流感病毒

DVAX1, 3, 4, 5, 6 分别代表加代号为 DVAX1, 3, 4, 5, 6 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸

IFN：干扰素 $\alpha$ ，长春生物制品研究所

C, D, E 1-10; F, G, H 3-4：为一献血员的外周血单个核细胞诱导上清。

C, D, E 11-12; F, G, H 5-12：为另一献血员的外周血单个核细胞诱导上



清。

图 1 的结果表明, 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 DVAX-1, DVAX-3, DVAX-4, DVAX-5 和 DVAX-6 (SEQ ID NO: 1-5) 具有刺激人外周血单个核细胞产生抗流感病毒物质的作用, 这些物质对流感病毒攻击 Vero 细胞具有明确的保护作用; 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸 DVAX-1, DVAX-3, DVAX-4, DVAX-5 和 DVAX-6 (SEQ ID NO: 1-5) 对流感病毒感染引起的流感等人呼吸道的传染性疾病具有治疗和预防的作用。

实施例 3、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒 SARS 病毒的作用

#### 1、人外周血单个核细胞的分离

同实施例 2

#### 2、获取 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清

将含人外周血 PBMC 的 10%FCS RPMI1640 完全培养液 (10%胎牛血清的 RPMI1640 的配制: 灭活的小牛血清 10 毫升, RPMI 1640 培养液 90 毫升) 接种于 12 孔培养板, 每孔 2ml, 细胞浓度为  $4 \times 10^6$  细胞/ml, 加滤过除菌的 CpG ODN (DVAX-1), 终浓度分别为 25 $\mu$ g/ml, 12.5 $\mu$ g/ml, 6.25 $\mu$ g/ml 和 3.13 $\mu$ g/ml。设培养液对照 (不加 CpG ODN)。37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 小时, 收集上清, 置-20℃备用。

#### 3、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗 SARS 病毒作用的测定

本实验在中国疾病预防控制中心病毒预防控制所完成。

将非洲绿猴肾传代细胞 (VERO E6, 由中国疾病预防控制中心病毒预防控制所提供) 接种于 96 孔培养板, 细胞的浓度为  $4 \times 10^5$ /ml, 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养 24 小时, 吸弃培养液。加入 100TCCID<sub>50</sub> 冠状病毒 Sino-5 分离株病毒[(SARS 病人急性血清 04 号标本): 由北京佑安门医院提供, 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所鉴定保存], 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养 2 小时, 弃掉病毒液。加入 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清, 每孔 100 $\mu$ l, 设两个复孔。设重组人干扰素 $\alpha$ 2b (远策素, 阳性对照药物, 100 万 IU/支, 文号: 国药准字 S19990013, 批号: 000503A,

北京远策药业有限责任公司出品)和培养基对照,细胞对照和病毒对照,37℃、5%CO<sub>2</sub>培养6天。在显微镜下观察细胞病变(CPE),出现25%病变记“+”,出现26~50%病变记“++”,出现51~75%病变记“+++”,出现76~100%病变记“++++”。在观察CPE结束后,每孔加100μL 0.5%结晶紫染色液(结晶紫0.5克,NaCl 0.85克,溶于50ml无水乙醚,3ml甲醛,47ml蒸馏水中),37℃、5%CO<sub>2</sub>培养15分钟。流水冲洗。每孔加入100μl脱色液(乙二醇单甲醚50ml,蒸馏水50ml)。室温振荡2小时后,用ELISA检测仪测OD(492nm)值。

#### 结果分析:

##### CPE法实验结果表明:

25μg/ml CpG ODN (DVAX-1)刺激(48小时)人PBMC培养上清稀释到1:160对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果

12.5/ml CpG ODN (DVAX-1)刺激(48小时)人PBMC培养上清稀释到1:80对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果

6.25/ml CpG ODN (DVAX-1)刺激(48小时)人PBMC培养上清稀释到1:40对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果

重组人干扰素α2b:在稀释到5万单位以上对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果。

不含CpG ODN的培养基上清对照冠状病毒(Sino-5分离株)没有抑制效果。

##### 结晶紫染色法实验结果表明:

25μg/ml CpG ODN (DVAX-1)刺激(48小时)人PBMC培养上清稀释到1:80对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果

12.5/ml CpG ODN (DVAX-1)刺激(48小时)人PBMC培养上清稀释到1:80对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果

6.25/ml CpG ODN (DVAX-1)刺激(48小时)人PBMC培养上清稀释到1:20对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果

重组人干扰素α2b:在稀释到5万单位以上对冠状病毒(Sino-5分离株)有抑制效果。

不含 CpG ODN 的培养基上清对冠状病毒 (Sino-5 分离株) 没有抑制效果。

上述结果表明, CpG ODN (DVAX-1) 刺激的人外周血单个核细胞诱导上清中含抗单股正链 RNA 病毒 SARS 病毒的物质; CpG ODN (DVAX-1) 可通过刺激细胞产生抗病毒物质发挥抗单股正链 RNA 病毒 SARS 病毒的作用。

实施例 4、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒登革热病毒的作用

1、人外周血单个核细胞的分离

同实施例 2。

2、获取 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清  
同实施例 3。

3、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗登革热病毒作用的测定

将 200 $\mu$ l VERO E6 细胞悬液接种于 96 孔培养板, 细胞的浓度为  $4 \times 10^5$ /ml, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养 24 小时, 吸弃培养液。加入 100TCCID<sub>50</sub> 登革热病毒 (D2V strain NGC, 用 C6/36 昆虫细胞 (ATCC) 制备), 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养 2 小时, 弃掉病毒液。加入 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清, 每孔 100 $\mu$ l, 设三个复孔。设细胞对照和病毒对照, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养 8 天。在显微镜下观察细胞病变 (CPE), 出现 25%病变记“+”, 出现 26-50%病变记“++”, 出现 51-75%病变记“+++”, 出现 76-100%病变记“++++”。

CPE 法实验结果表明:

25 $\mu$ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对登革热病毒有抑制效果

12.5 $\mu$ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对登革热病毒有抑制效果

6.25 $\mu$ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:40 对登革热病毒有抑制效果

不含 CpG ODN 的培养基上清对登革热病毒没有抑制效果。病毒对

照的细胞全部发生病变。

上述结果表明，CpG ODN (DVAX-1) 刺激的人外周血单个核细胞诱导上清中含抗单股正链 RNA 病毒登革热病毒的物质；CpG ODN (DVAX-1) 可通过刺激细胞产生抗病毒物质而发挥抗单股正链 RNA 病毒登革热病毒的作用。

实施例 5、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的抗单股正链 RNA 病毒日本脑炎病毒的作用

1、人外周血单个核细胞的分离

同实施例 2。

2、获取 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清

同实施例 3。

3、人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸抗日本脑炎病毒作用的测定

将 200  $\mu$ l BHK-21 细胞悬液（来自内蒙生物制药厂）接种于 96 孔培养板，细胞的浓度为  $4 \times 10^5/\text{ml}$ ， $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养 24 小时，吸弃培养液。加入 100 TCCID<sub>50</sub> 日本脑炎病毒（来自长春生物制品研究所。）， $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养 2 小时，弃掉病毒液。加入 CpG ODN (DVAX-1) 刺激人外周血 PBMC 培养上清，每孔 100 $\mu$ l，设三个复孔。设细胞对照和病毒对照， $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养 4 天。在显微镜下观察细胞病变 (CPE)，出现 25% 病变记“+”，出现 26-50% 病变记“++”，出现 51-75% 病变记“+++”，出现 76-100% 病变记“++++”。

CPE 法实验结果表明：

25 $\mu$ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:160 对日本脑炎病毒有抑制效果。

12.5 $\mu$ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:80 对日本脑炎病毒有抑制效果

6.25 $\mu$ g/ml CpG ODN (DVAX-1) 刺激 (48 小时) 人 PBMC 培养上清稀释到 1:40 对日本脑炎病毒有抑制效果

不含 CpG ODN 的培养基上清对日本脑炎病毒没有抑制效果。病毒

对照的细胞全部发生病变。

上述结果表明，CpG ODN (DVAX-1) 刺激的人外周血单个核细胞诱导上清中含抗单股正链 RNA 病毒日本脑炎病毒的物质；CpG ODN (DVAX-1) 可通过刺激细胞产生抗病毒物质而发挥抗单股正链 RNA 病毒日本脑炎病毒的作用。

## 权利要求书

1. 人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸，其由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成。

2. 根据权利要求 1 所述的寡核苷酸，其具有选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 所示的序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸，其具有诱生细胞产生抗病毒物质的作用。

4. 根据权利要求 3 的寡核苷酸，其中所述的病毒是单股正链 RNA 病毒或流感病毒。

5. 根据权利要求 4 的寡核苷酸，其中所述单股正链 RNA 病毒是变异的冠状病毒或黄病毒科病毒。

6. 根据权利要求 5 的寡核苷酸，其中所述变异的冠状病毒是 SARS 病毒。

7. 根据权利要求 5 的寡核苷酸，其中所述黄病毒科病毒是丙型肝炎病毒、登革热病毒或日本脑炎病毒。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的寡核苷酸，它们的磷酸二酯键是非硫化、部分硫化或全部硫化的。

9. 含有权利要求 1-8 中任一项所述的寡核苷酸的组合物。

10. 权利要求 9 所述的组合物，其还包括其它抗病毒的药物或疫苗。

11. 权利要求 1-8 中任一项所述的寡核苷酸或权利要求 9、10 中任一项的组合物用于诱生细胞产生抗病毒物质的用途。

12. 权利要求 1-8 中任一项所述的寡核苷酸或权利要求 9、10 中任一项的组合物在制备用于预防或治疗由病毒引起的疾病的药物中的用途。

13. 根据权利要求 11 或 12 的用途，其中所述的病毒是单股正链 RNA 病毒或流感病毒。

14. 根据权利要求 13 的用途，其中所述单股正链 RNA 病毒是变异

的冠状病毒或黄病毒科病毒。

15. 根据权利要求 14 的用途，其中所述变异的冠状病毒是 SARS 病毒。

16. 根据权利要求 14 的用途，其中所述黄病毒科病毒是丙型肝炎病毒、登革热病毒或日本脑炎病毒。

## 说明书附图

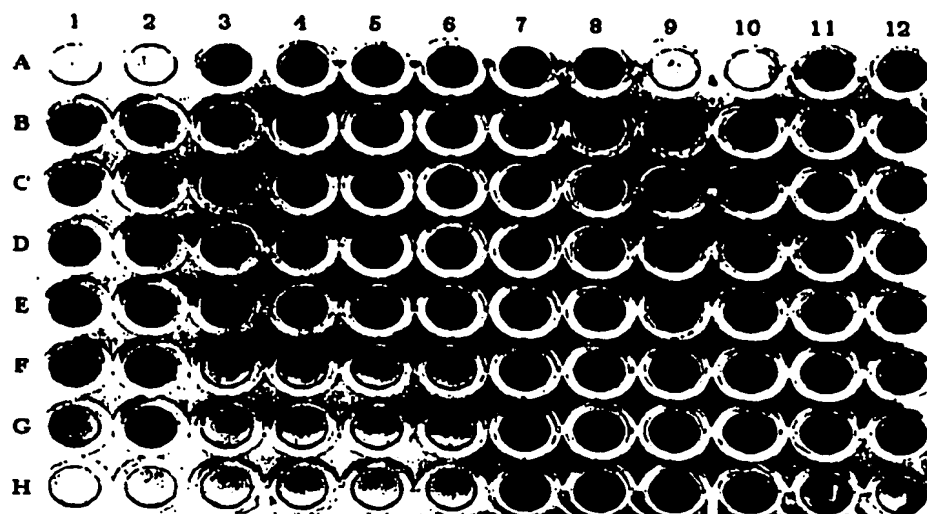


图 1



## 序 列 表

### SEQUENCE LISTING

<110> 长春华普生物技术有限公司

<120> 人工合成的 CpG 单链脱氧寡核苷酸及其抗病毒作用

<160> 5

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 1

tcgtcgggtg cgacgtcgca gggggg

26

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 2

tcgtcgtttc gtcgttgggg

20

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 3

tcgacgttcg tcgttcgtcg ttc

23

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 4

tcggggacga tcgtcggggg g

21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 5

ggatcgatcg atcgatgggg gg

22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/000863

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup>: C07H21/04,A61K31/7084,A61K31/7088,A61P31/14,A61P11/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup>: C07H,A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank, EMBL,DDBJ,PDB, PIR,WPI JAP,CNPAT

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PENG Xiao-mou et al, Synthesis of single-stranded DNA probe using technique of primer length-asymmetric PCR, Chin J Lab Diagn,2002.8,6(4) :pp206~208	1
A		2-16
X	YUAN Yun-fei et al,The Roles of DNA Methylation in HumanNeoplasms,Chinese Journal of Cancer,2002,21(11):1267~1277	1
A		2-16
X	LI Jiang-ling et al, The effect of Transgenic Expression of Porcine Interleukin 6 Gene and CpG Sequence on Immune Responses of Mice Inoculated with the Gene Vaccine of Taenia Solium of Pig, High Tech Communications ,2002.6	1
A		2-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26.Oct.2004

Date of mailing of the international search report  
09·DEC 2004 (03·12·2004)

Name and mailing address of the ISA/CN  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,  
100088 Beijing, China  
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer  
Wang PengFei  
Telephone No. 86-10-62085299

国际检索报告

国际申请号  
PCT/CN2004/000863

A. 主题的分类

IPC<sup>7</sup>: C07H21/04, A61K31/7084, A61K31/7088, A61P31/14, A61P11/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC<sup>7</sup>: C07H, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, PIR, WPI JAP, CNPAT

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	彭晓谋等, 引物长度不对称 PCR 技术制备单链 DNA 探针, 中国实验诊断学, 2002 年 8 月, 6(4): 第 206~208 页	1
A		2-16
X	元云飞等, 肿瘤相关基因过甲基化的研究进展, 癌症, 2002, 21(11): 1267-1277	1
A		2-16
X	李江凌等, CpG 序列和猪白细胞介素-6 基因转染表达对猪囊尾蚴基因疫苗影响的研究, 高技术通讯, 2002 年 6 月	1
A		2-16

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期  
26.10 月 2004(26.10.2004)

国际检索报告日期 2004 (09.12.2004)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088  
传真号: (86-10)62019451

授权官员

王朋飞

电话号码: (86-10) 62085299

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**